

令和元年6月19日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19728

研究課題名(和文)クロマチン情報に基づく新規骨粗鬆症治療標的分子の解析

研究課題名(英文) Analysis of new therapeutic target molecules for osteoporosis based on the chromatin information

研究代表者

今井 祐記 (Imai, Yuuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：10423873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：Zscan10は転写因子であることが報告されているものの、いろいろな細胞における役割については大部分が不明である。今回我々はCRISPR/Cas9によりZscan10を欠損させたRAW264細胞(KO細胞)を樹立し、その機能について解析した。分化誘導後のKO細胞ではCtrl細胞と比較して破骨細胞分化の促進が認められた。そこで、RNA-seqにより分化誘導前のKO細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施し、統合的なゲノムワイド解析を行った結果、Haptoglobin (Hp)を同定した。Zscan10はHpの転写を直接的に制御することで、破骨細胞分化を負に制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規破骨細胞転写因子Zscan10の同定から、統合的ゲノムワイド解析により明らかとなったハプトグロビン(Hp)が骨代謝制御の標的分子になりうるということが明らかとなった。これまでにHp KOマウスでは骨量の減少及び破骨細胞数の増加を呈し、Hpが破骨細胞分化の抑制に関与すること、Hpが低値を示す溶血性貧血の患者では、骨量の減少を引き起こすことが報告されている。以上のような報告から、生体においてもHpが骨代謝に対し保護的作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Zinc finger and SCAN domain containing 10 (Zscan10) was identified as a novel transcription factor that is involved in osteoclast differentiation in our previous report. However, the biological functions of Zscan10 are not fully understood. First, Zscan10 KO RAW264 (KO) cells were established by genome editing using CRISPR/Cas9 and single cell sorting. Zscan10 might regulate transcription of the genes that negatively control osteoclastogenesis. To understand gene expression profiles controlled by Zscan10, RNA-seq was performed and stringent analyses identified the haptoglobin gene (Hp) as a possible target of Zscan10. rHp treatment suppressed TRAP activity of KO cells without affecting cell viability. Furthermore, it has been reported that Hp KO mice exhibit decreased bone mass and increased osteoclast number. Taken together, this study suggests that Zscan10 negatively regulates osteoclast differentiation through transcription of Hp.

研究分野：整形外科学

キーワード：破骨細胞 Zscan10 転写因子 RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国をはじめとした先進諸国において、健康長寿の獲得が極めて重要な社会的課題である。中でも、運動器疾患は要介護・要支援となる原因の約 1 / 3 を占めている。また骨粗鬆症による脊椎及び大腿骨近位部骨折が寝たきりになる要因となっているため、骨粗鬆症治療を目指した病態解明や新規治療法開発は、今尚必要とされている。申請者は、これまで閉経後骨粗鬆症の病態についてエストロゲン受容体を中心としてメカニズム解明に取り組んできた (Cell 2007, JBMR 2009, Mol Cell Endocrinol 2009, Physiol Rev 2011, Bone 2013 など)。これまでの研究は、閉経後に生じるエストロゲン欠乏による病態の解明に中心を置いてきたが、それでもなお、十分に病態を説明できない表現型が認められた。その理由の一つとして、閉経後骨粗鬆症におけるエストロゲン欠乏などの既知の分子や既存の概念に捉われていることが考えられた。

そこで、近年目覚ましい発展を遂げている次世代シーケンサをはじめとした先進的技術とバイオインフォマティクスやビッグデータを活用することで、これまでに誰も着目してこなかった未知の分子を捉えることができれば、さらなる病態の理解に繋がるのではないかと考え、研究の方向性を転換した。クロマチンは、遺伝子発現変動に伴ってダイナミックに構造変換する。このクロマチン構造変換はエピジェネティクスの一端を担っており、この情報を詳細に解析することにより、新たな制御分子の同定が可能になるのではないかと考えた。その結果、培養細胞レベルで DNase-seq を用いた解析から、Zscan10 を含む新規候補分子を同定した (JBMR 2014) もの、あくまでも細胞レベルであり、病態の理解には、分子機能の解明と生体レベルでの解析が不可欠であると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

65 歳以上人口が 25 % を越え、ついに超高齢社会に突入した我が国において、社会福祉および医療経済の観点から、健康長寿の獲得が社会的急務である。そのためには、要介護・要支援の 3 大原因の一つである運動器疾患の克服が重要であり、その一つに骨折が挙げられる。骨粗鬆症患者では、軽微な転倒により大腿骨近位部や脊椎骨の骨折を来し、臥床や手術を余儀なくされ、生活の質の低下のみならず寿命短縮を引き起こす。現在、骨粗鬆症の病態解明や治療法開発が進展した結果、骨粗鬆症治療が奏効し、他の先進国では骨粗鬆症性骨折が減少しているにもかかわらず、わが国では骨粗鬆症性骨折数が増加傾向にあり、さらなる治療標的の探索が必要である。申請者は、閉経後骨粗鬆症が破骨細胞寿命延長により惹起されることを見出すなど病態メカニズム解明に取り組んできた (Cell 2007)。さらにエピジェネティクスに着目し、破骨細胞分化過程におけるクロマチンリモデリングに注目して研究を行ってきた。その結果、DNase Hypersensitive site (DHS) の DNase-seq を用いたゲノムワイド解析により、破骨細胞分化を制御する複数の新規転写因子の同定に成功した (JBMR 2014, BBA-MBD 2015)。これらの因子の中でも、Zscan10 については、これまでにその分子機能は未知であり、関連論文は 8 報のみ (上記 JBMR 論文を含む) しか報告されておらず、骨代謝制御に関する生理作用及び骨粗鬆症病態についての役割は全く不明である。そこで、本研究では、この機能未知因子 Zscan10 の分子機能を明らかにすること、また生体における分子の役割について遺伝子欠損マウスを解析することにより明らかにした上で、Zscan10 が骨粗鬆症治療に向けた分子標的として機能するか否かを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

骨髄細胞由来初代培養を用いた M-CSF 及び RANKL 誘導による破骨細胞分化の解析も遂行する。RANKL 投与 6 日目における破骨細胞形成を、TRAP 染色を用いて定量的に評価する。また、経時的に破骨細胞から RNA を抽出し、Nfatc1 などの分化マーカーの発現変動を検索する。Zscan10 による遺伝子発現プロファイルの変動を確認するため、RNA-seq を行い、その結果とこれまでに実施されてきたゲノムワイド解析データを統合的に解析し、Zscan10 の標的遺伝子を同定。標的因子による破骨細胞分化制御について解析する。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 により Zscan10 を欠損させた RAW264 細胞 (KO 細胞) を樹立し、その機能について解析した。

分化誘導後の KO 細胞では Ctrl 細胞と比較して破骨細胞分化マーカーの mRNA 発現量、破骨細胞の大きさや数、TRAP 活性は顕著に増加しており、破骨細胞分化の促進が認められた (図 1)。さらに、分化抑制関連遺伝子の mRNA 発現量は分化誘導前から変動しており、KO 細胞では分化誘導前の遺伝子発現プロファイルの変化が破骨細胞分化促進に寄与しているのではないかと考えられた。そこで、RNA-seq により分化誘導前の KO 細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、Ctrl 細胞と比較して KO 細胞では 173 遺伝子の発現量が 1/2 以下に減少、87 遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加していた。これらの遺伝子群の Gene ontology 解析を実施した結果、減少した遺伝子群は免疫系システムに参与している遺伝子が多く含まれており、減少遺伝子群が KO 細胞の分化促進という表現型に深く関与してい

ると考えられた。そこで、発現が減少した遺伝子群が、転写因子である Zscan10 により直接制御されるのか検索するため、RNA-seq データに加え、Zscan10 結合塩基配列モチーフのゲノムワイド情報および RAW 細胞のクロマチン構造変換を解析した DNase-seq データを組み合わせ、統合的なゲノムワイド解析を行った。その結果、Zscan10 の欠損により遺伝子発現が低下し、遺伝子座近傍ゲノム領域に結合モチーフ及びクロマチン構造変換を伴う遺伝子として Haptoglobin (Hp) を同定した。さらにリコンビナント Hp を KO 細胞および骨髓細胞由来初代培養破骨細胞に添加し解析した結果、破骨細胞分化が抑制された (図 1)。これまでの結果から、Zscan10 は Hp の転写を直接的に制御することで、破骨細胞分化を負に制御していることが、Zscan10 KO 細胞における分化促進の一因であることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Ikedo A, Kido K, Ato S, Sato K, Lee JW, Fujita S and Imai Y.
The effects of resistance training on bone mineral density and bone quality in type 2 diabetic rats.
Physiol Rep. 2019 Mar; 7(6), e14046. (査読有)
- 2) Yanagihara Y, Inoue K, Saeki N, Sawada Y, Yoshida S, Lee JW, Iimura T and Imai Y.
Zscan10 Suppresses Osteoclast Differentiation by Regulating Expression of *Haptoglobin*.
Bone. 2019 122:93-100. (査読有)
- 3) Yamashita M, Inoue K, Saeki N, Ideta-Otsuka M, Yanagihara Y, Sawada Y, Sakakibara I, Lee JW, Ichikawa K, Kamei Y, Iimura T, Igarashi K, Takada Y, Imai Y.
Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression.
Development. 2018 Jan8;145(1).pii: dev157412. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) Zscan10 Suppresses Osteoclast Differentiation through Expression of Haptoglobin.
Yuta Yanagihara, Kazuki Inoue, Noritaka Saeki, Yuichiro Sawada, Jiwon Lee, Tadahiro Iimura, Yuuki Imai
The American Society for Bone and Mineral Research 2018 Annual Meeting, Sep 28-Oct 1, 2018, Montreal, Canada
- 2) Zscan10 Suppresses Osteoclast Differentiation by Regulating Expression of Haptoglobin
Yuta Yanagihara, Kazuki Inoue, Noritaka Saeki, Yuichiro Sawada, Jiwon Lee, Tadahiro Iimura, Yuuki Imai
Protein Island Matsuyama 2018 International Symposium, September 12, 2018, Matsuyama, Japan
- 3) Zscan10 Suppresses Osteoclast Differentiation by Regulating Expression of Haptoglobin
Yuta Yanagihara, Kazuki Inoue, Noritaka Saeki, Yuichiro Sawada, Jiwon Lee, Tadahiro Iimura, Yuuki Imai
The 15th Bone Biology Forum, 2018, 8月17~18日, 千葉県美浜区
- 4) Zscan10 は Haptoglobin の転写を介して破骨細胞分化を負に制御する
柳原裕太, 井上和樹, 佐伯法学, 沢田雄一郎, 李智媛, 飯村忠浩, 今井祐記
第 36 回日本骨代謝学会学術集会, 2018, 7月26~28日, 長崎市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：骨増強作用を示すフラボノイド
発明者：今井祐記、菅原卓也、西脇寿
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：用途特許
番号：特願 2018-175813
出願年：2018 年
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imalab>
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/skeletal/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：柳原裕太、飯村忠浩、佐伯法学、李智媛
ローマ字氏名：Yuta Yanagihara, Tadahiro Imura, Noritaka Saeki, Jiwon Lee

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。